

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 20520071150949

UDC _____

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

将外源基因导入哺乳动物细胞条件的优化

Optimization of gene transfection conditon
in eukaryotic cells

洪 蒙

指导教师姓名: 韩家淮 教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2010 年 04 月

论文答辩时间: 2010 年 06 月

学位授予日期: 2009 年 月

答辩委员会主席: 李勤喜教授

评 阅 人: _____

20010 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ）1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ）2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

将外源基因导入真核细胞的方法有很多，但是很多转染方法的具体细节以及适宜的条件和使用的细胞仍然没有完全研究清楚。本文主要针对实验室常用的几种转染方法：PEI转染、磷酸钙共沉淀转染和电穿孔转染，以期找出其各自适合的使用条件和细胞。

PEI转染和磷酸钙共沉淀转染都是通过转染试剂与DNA静电结合，随后吸附到细胞膜上通过内吞作用进入细胞的。静电结合是通过正负电荷的相互吸引而产生的，所以复合物的形成可能和缓冲液中的正负离子的含量有关。本论文通过研究pH值与PEI、磷酸钙与DNA形成的颗粒的大小的关系，以及颗粒大小对转染效率的影响来研究PEI转染和磷酸钙共沉淀转染的机制。结果表明pH值在6.7-7.5之间时，PEI和DNA形成的颗粒的大小和pH值并不存在明确的规律性的联系；同样，pH值在6.96-7.43之间时，磷酸钙和DNA形成的颗粒的大小和pH值也没有明确的联系。形成的复合物大小在100-1100 nm之间时，在此之间的颗粒的大小对转染效率也没有明显的影响。

电穿孔转染的原理是指将细胞放在短暂、高压电流脉冲环境中，细胞膜在电击作用下形成纳米级大小的微孔，DNA直接通过微孔进入细胞质或者在微孔闭合伴随发生的细胞膜组分重新分布时进入细胞。电穿孔转染效率和转染后细胞的存活率与使用的缓冲液有很大的关系，本论文通过一系列的实验得到了比较适合MEF细胞的电穿孔转染缓冲液的配方：100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 50 mM Glycerol, 50 mM Glucose, 10 mM KH₂PO₄ /K₂HPO₄, 1% DMSO。

本论文通过研究pH值对PEI、磷酸钙与DNA形成复合物的影响，以及电穿孔转染缓冲液中不同成分和浓度对转染效率和细胞的成活率的影响，明确了不同转染方法的影响因素，为寻找不同细胞的最适合转染方式提供了帮助。

关键词：PEI；磷酸钙；电穿孔；转染效率；内吞作用

Abstract

There are a lot of methods for introduction of foreign nucleic acids (DNA or RNA) into eukaryotic cells. But there are still many issues unclear, such as the details of how these transfection process, and how to obtain higher efficiency by optimization of the transfection condition. This thesis focuses on three transfection methods: PEI transfection, calcium phosphate precipitation transfection and electroporation transfection, in order to find out the appropriate way to deliver genes into cells.

The mechanisms of PEI transfection and calcium phosphate precipitation transfection are similar. They are both based on electrostatic interaction between DNA and transfection reagents. The positively charged amino groups of PEI, and the positively charged calcium ion can attract the negatively charged DNA. This thesis try to figure out whether pH value of the buffer influences the size of complex formed by PEI or calcium phosphate combine with DNA, and if the size of complex affect the transfect efficiency. This thesis confirms that there is no obvious relevance of pH value to the size of the complex, when the pH value of buffer is between 6.7 and 7.5. And the result also displays no relationship between the size of the complex and the efficiency of transfection, if the size of the complex is 100-1100 nm.

When cells are transient exposed to a high external electric field, It will lead to a reversible transient increase in the permeability of the cell membrane to ions and molecules. This process is known as electroporation transfection. There is great relationship between the content of transfection buffer and the efficiency of electroporation and the viability of the cells after electroporation. Through a series of experiments in this paper, A suitable buffer for MEF is optimized for electroporation transfection. The formula is: 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 50 mM Glycerol, 50 mM Glucose, 10 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, 1% DMSO, add H₂O to 100 μ L.

In this study, we found out the relationship between the size of the complex that

formed by transfection reagent combined with DNA and the pH value of buffer, and the effect of different electroporation buffer on the transfection efficiency and the viability of the cells after electroporation. And we found a method to optimize electroporation buffer, this will facilitate our finding of the appropriate transfection method for various kinds of cells.

Key Words: PEI, calcium phosphate precipitation transfection, electroporation

目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	II
第一章 前言.....	1
1.1 细胞的内吞作用	1
1.2 病毒载体以及其缺陷	2
1.3 非病毒载体	3
1.3.1 PEI 转染.....	4
1.3.2 磷酸钙转染.....	11
1.4 无载体的真核细胞转染	17
1.4.1 电穿孔转染.....	17
1.5 立题背景	19
第二章 材料和方法.....	22
2.1 实验药品和试剂	22
2.2 实验室主要仪器	22
2.3 大肠杆菌感受态细胞的制备和质粒转化	22
2.3.1 感受态细胞的制备.....	22
2.3.2 质粒转化感受态细胞.....	23
2.3.3 质粒 DNA 的提取	24
2.4 细胞相关实验和方法	25
2.4.1 细胞培养.....	25
2.4.2 细胞转染.....	26
2.4.3 细胞转染效率的测定.....	28
2.4.4 颗粒大小的测定.....	29
第三章 结果和讨论.....	31

3.1 PEI 转染	31
3.1.1 不同的缓冲液和不同 pH 值下 PEI 和 DNA 形成的颗粒的大小	31
3.1.2 不同的缓冲液和不同 pH 值下转染效率.....	32
3.2 磷酸钙转染	34
3.2.1 不同 pH 值下磷酸钙和 DNA 形成的颗粒的大小	34
3.2.2 不同 pH 值下转染效率.....	35
3.3 电转染	36
3.3.1 不同细胞对电转缓冲液中的 K^+ 、 Na^+ 的选择及浓度的要求	36
3.3.2 低渗更利于细胞电穿孔转染.....	37
3.3.3 针对 MEF 的电穿孔缓冲液进行进一步的优化	38
3.4 结果分析	43
附录 1：图表索引	45
附录 2：缩略语及中英文对照	46
参考文献	48
致 谢	55

TABLE OF CONTENT

ABSTRACT (IN CHINESE)	I
ABSTRACT (IN ENGLISH)	II
CHAPTER 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Cell endocytosis	1
1.2 Virus vector and their disadvantage.....	2
1.3 Non-viral vector	3
1.3.1 PEI transfection.....	4
1.3.2 Calcium phosphate precipitation transfection.....	11
1.4 Transfection without vector	17
1.4.1 Electroporation transfection.....	17
1.5 Background of this thesis	19
CHAPTER 2 MATERIALS AND METHODS.....	22
2.1 Drugs and reagents	22
2.2 Instruments.....	22
2.3 Preparation of competent cells and transformation	22
2.3.1 Preparation of competent cells.....	22
2.3.2 Transformation of DNA into competent cells.....	23
2.3.3 Preparation of plasmid DNA	24
2.4 Experiments and methods for cell	25
2.4.1 Cell culture.....	25
2.4.2 Transfection.....	26
2.4.3 Detemination of transfection efficiency.....	28
2.4.4 Measure the size of complex.....	29
CHAPTER 3 RESULTS AND ANALYSIS.....	31
3.1 PEI transfection	31
3.1.1 Relationship between the pH value of buffer and the size of the complex	

with DNA.....	31
3.1.2 Relationship between the pH value of buffer and efficiency of transfection	32
3.2 Calcium phosphate transfection	34
3.2.1 Relationship between the pH value of buffer and the size of the complex with DNA.....	34
3.2.2 Relationship between the pH value of buffer and efficiency of transfection	35
3.3 Electroporation transfection	36
3.3.1 Different cell prefer different ion and concentration	36
3.3.2 Hypoosmolar is better than isoosmolar.....	37
3.3.3 Optimization the electroporation buffer for MEF cell.....	38
3.4 Conclusions and discussion	43
APPENDIX 1 INDEX OF FIGURES AND TABLES	45
APPENDIX 2 ABBREVIATIONS	46
REFERENCE.....	48
ACKNOWLEDGEMENT	55

第一章 前言

细胞转染是一种应用广泛的将外源的DNA或RNA等导入真核细胞细胞的生物学方法，以控制细胞内的一些进程，如诱导或抑制某些蛋白的表达等。自从20世纪六七十年代确定了细胞膜的双分子层结构以后，到1973年就有将外源的DNA转染入细胞的报道^[1]。随着分子生物学和细胞生物学研究的不断发展，转染已经成为研究和控制真核细胞基因功能的重要技术之一。在研究基因功能、调控基因表达、突变分析、蛋白质生产以及基因治疗中的到了广泛应用。影响转染效率的因素有很多，细胞株本身的特性和活性，细胞培养的条件，转染时DNA或RNA的摩尔量以及纯度，转染方法，转染试剂的选择等都非常重要，这里我们主要研究一下不同转染方法和条件对转染效率的影响。

在此之前，首先介绍一下外源物质通过除扩散以为得方式进入细胞的机制。

1.1 细胞的内吞作用

内吞作用(endocytosis)又称入胞作用，是通过质膜的变形运动将细胞外物质转运入细胞内的过程。这些物质通常是大的极性分子是不能通过疏水的质膜和细胞膜的。在转运过程中，物质包裹在脂双层膜围绕的囊泡中，因此又称膜泡运输。在这种形式的运输过程中涉及膜的融合和断裂，因此也需要消耗能量，属于主运输。根据入胞物质的不同大小，以及入胞机制的不同可将内吞作用分为三种类型：吞噬作用(phagocytosis)、胞饮作用(pinocytosis)、受体介导的胞吞作用(receptor mediated endocytosis)。

1、吞噬作用(phagocytosis)是指摄入大的颗粒性物质（如微生物和细胞碎片）的过程。在摄入颗粒物质时，细胞部分变形，使质膜凹陷或形成伪足将颗粒包裹摄入细胞，吞噬泡的直径往往大于 250 nm。伪足的伸出是由肌动蛋白参与的，若用抑制肌动蛋白聚合的药物如细胞松弛素能抑制细胞吞噬。

2、胞饮作用(pinocytosis)是细胞摄入溶质或液体的过程。细胞胞饮时局部质膜下陷形成一小窝，包围液体物质，然后小窝离开质膜，通常形成直径小于 150nm 的小泡，进入细胞。胞饮作用分为液相胞饮和吸附胞饮。前一

种方式为非特异性细胞把细胞外液及其内可溶性物质摄入细胞内。后一种方式中，细胞外大分子或颗粒物质先以某种方式吸附在细胞表面，随后被摄入细胞内。吸附胞饮有一定的特异性。

无论是吞噬还是胞饮作用都是非受体介导的内吞作用，这可能会导致细胞吞入一些非特异性的，细胞并不需要的物质。

3、受体介导的内吞作用(receptor mediated endocytosis)是细胞依靠细胞表面的受体特异性地摄取细胞外蛋白或其他化合物的过程。细胞表面的受体具有高度特异性，与相应配体(被内吞的分子)结合形成复合物，继而此部分质膜凹陷形成有被小窝，小窝与质膜脱离形成有被小泡，将细胞外物质摄入细胞内。有被小泡进入细胞后，脱去外衣，与胞内体的小囊泡结合形成大的内体，其内容呈酸性，使受体与配体分离。带有受体的部分膜结构芽生、脱落，再与质膜融合，受体又回到质膜，完成受体的再循环。

在内吞过程中，质膜上受体与配体特异结合部位的胞质面(将形成有被小泡的外衣)有一些蛋白附着：①网格蛋白(clathrin)是其中最主要的一种蛋白。它是一种纤维蛋白，与另一种较小的多肽形成了有被小泡外衣的结构单位，即三脚蛋白复合物(triskelion)。三脚蛋白复合物包括三个网格蛋白和三个较小的多肽。由许多三脚蛋白复合物聚合构成五边形或六边形的网格样结构，覆于有被小泡或有被小窝的胞质面。由网格蛋白装配成的外衣提供了牵动质膜的机械力，导致有被小窝的下凹，也有助于捕获膜上的特异受体及与之结合的被转运分子；②调节素是有被小泡中组成外衣的另一类重要的蛋白，它是多亚基的复合物，能识别特异的跨膜蛋白受体，并将其连接至三脚蛋白复合物上，起选择性介导作用。跨膜受体蛋白胞质面肽链尾部，常在一个由四个氨基酸残基构成的区域内高度转折，形成一个内吞信号，由调节素识别它。所以调节素可介导不同类型受体，使细胞能捕获不同类型的物质^[2]。

1.2 病毒载体以及其缺陷

尽管有些细胞可以吸收DNA，但是这种效果很差，总体来说核酸自身很难穿过细胞膜，这就需要借助于一些载体或改变细胞的状态。真核细胞转染使用的载体的很多，根据其载体性质不同分为病毒载体的转染和非病毒载体的转染方法。病毒载体的方法是假借病毒作为目的基因的载体，利用病毒感染细胞从而实

现将外源基因转入宿主细胞。病毒可以高效率地进入特定的细胞类型,复制所携带DNA 并表达自身蛋白产生新的病毒粒子,因此被改造成基因转染的载体。如逆转录病毒(retrovirus)、腺病毒(adenovirus)、单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)、腺病毒相关病毒(adenovirus-associated virus, AAV)以及痘病毒(poxvirus)等。病毒型载体转染效率较高,但是由于其容量的局限性限制了所能携带的DNA的大小,而且其导向性差,制备滴度不够高,还存在免疫原性(immunogenicity)和病毒性重组(viral recombination)以及潜在致癌性等安全隐患。1991年出现过用腺病毒载体治疗一个年轻患者的鸟氨酸氨甲酰转移酶缺乏症,结果腺病毒引起了炎症反应并最终导致了患者的死亡^[2]。此外有些病毒对其感染的细胞所处的生理状态要求也很高,如慢病毒属于逆转录病毒,可以感染分裂和不分裂的细胞,大部分逆转录病毒只能感染分裂细胞,同样无论慢病毒还是其余的逆转录病毒都会整合到宿主细胞的基因组,存在导致基因突变和致癌的风险。2003年,一个患有严重免疫缺陷病的男孩在经过逆转录病毒为载体的基因治疗后患上了非遗传性白血病^[3]。

1.3 非病毒载体

相对于病毒载体,非病毒基因载体有病毒载体无法达到的优点,它们设计灵活、化学结构可控制、无传染性、低毒性、低免疫原性、低致癌性、不限制载体容量、易制备且可大量制备及可以实现细胞特异性和长期基因表达的优点。非病毒载体的研究主要包括修饰后的天然高分子和合成的高分子及其他。修饰后的天然高分子主要包括脂质类,如胆固醇;多糖类如壳多糖、DEAE-葡聚糖法、右旋糖苷和藻酸等;蛋白质类如胶原蛋白、鱼精蛋白等;以及多肽类的物质。合成的高分子主要是一些具有生物相容性的,可以生物降解的聚合物,如聚赖氨酸、聚乳酸、聚乙烯醇及其共聚物等;聚阳离子性的高分子包括聚乙烯亚胺(Polyethylenimine, PEI)、聚酰胺树枝状高分子等,这些载体分别以微球、囊泡或胶束等形式包裹DNA。其他非病毒载体转染技术还包括:磷酸钙法、以及新兴起的无机纳米技术如硅纳米颗粒等。

这些非病毒载体都是以超分子化学为理论基础的,在这些载体里DNA凝结成紧致状态,设计合适的聚合物大小使其与DNA复合后形成直径50-200 nm纳米颗粒^[4]。复合物阳离子化可以减小其大小且赋予其阳离子,利于与细胞接触而被

细胞通过内吞作用摄入。大到2.3 Mb的DNA都可以凝结与载体形成纳米颗粒利于基因传递^[5]。一旦DNA凝结与合成的载体复合，便可能成为有功能的分子或集成运输体，通过物理或化学结合便于DNA的特异性的细胞靶向，胞质释放和细胞和定位^[6, 7]。

众所周知，大部分的这种非病毒DNA传递载体大致可以分为三个比较重要的过程：DNA的凝结和复合物化，细胞内吞，入核或靶向核。

在负电荷的DNA分子在进入之前常和不同的阳离子载体凝结，复合物有额外的正电荷，这样载体-DNA复合物静电结合，吸附到带负电荷的细胞膜上通过内吞作用（endocytosis）被细胞摄入。被吞入后，大部分的携带DNA的颗粒仍在核周内体(perinuclear endosomes)或溶酶体(lysosomes)内。载体-DNA复合物停留在这些小泡内是基因转染的主要障碍之一。胞内体(Endosomes)和溶酶体(lysosomes)中的酶和低的pH值常导致载体中DNA的降解。从胞内体逃逸是DNA运输的重要需要之一，在细胞质中胞内体不稳定地释放DNA；然而，这种效率不高的过程存在于目前大部分的非病毒载体运输中^[8]。

1.3.1 PEI转染

1.3.1.1 PEI的分子结构

聚乙烯亚胺(Polyethylenimine, PEI)是一种常见的阳离子聚合物，常用于废水处理，造纸业以及洗发水沐浴露的制造等。它的结构在很大程度上决定它与DNA和RNA复合物的物理化学和生物的性质。PEI可以被修改以产生不同结构的新的衍生物，它的物理化学性质对生物现象和运输过程的影响到现在还不完全清楚，还需要经一步的研究。有线型PEI(Line PEI, LPEI)和分枝状PEI(Branched PEI, BPEI)两种形式，基于线型的转染试剂已经商业化了。PEI根据其聚合度有一系列的分子量，从小于1kDa到 1.6×10^3 kDa。普遍认为当PEI的分子量为5到25kDa是最适合做基因转染。分子质量越大细胞毒性也就越大^[9]，这可能是因为巨大的阳离子聚合物堆积在细胞膜外会诱导细胞坏死^[10]，相反低分子质量的细胞毒性会比较小^[11, 12]。Forrest et al曾将低分子质量的PEI 800 Da短的二丙烯酸酯连接成14-30 kDa，这样可以提高它的转染效率但细胞毒性却不大。生理条件下的酯

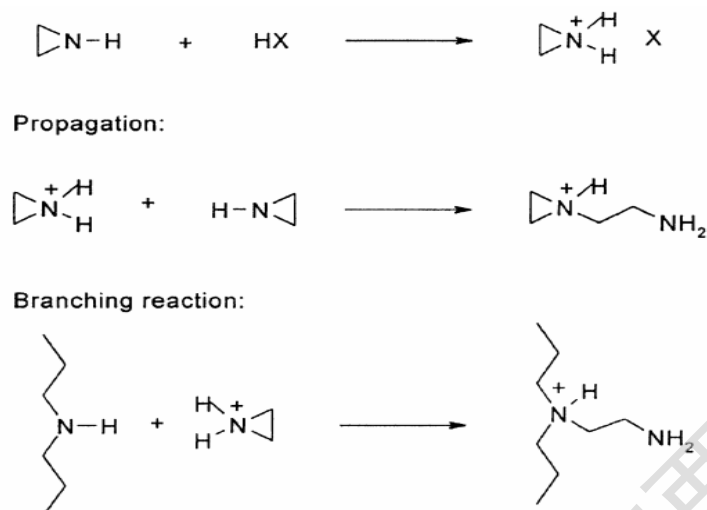


图1.1 分枝状PEI的合成

Fig 1.1 Synthesis of branched polyethylenimine by acid catalyzed polymerization of aziridine in aqueous solution

(by A. von Harpe, 2000)

键的水解和体外细胞毒性与它的降解行为有关。降解半衰期最短的聚合物细胞毒性最低且降解产物没有细胞毒性^[13]。

1.3.1.1.1 分枝状PEI

Dick和Ham根据杂环氮丙烷在酸的催化下形成聚合物的机制推测分枝型PEI的伯胺、仲胺、叔胺的理论比例是1: 2: 1^[3]，根据C13核磁共振检测发现大部分购买的可用的PEI其比例是1: 1: 1，说明分支的程度比理论的大^[3]。可能是合成的方法以及反应的条件导致了这种和理论值的偏差。PEI的分支越多在体外的细胞毒性就越大^[14]。对聚合物结构的精确了解有利于建立明确的结构和功能的关系，从而利于减小细胞毒性提高生物相容性。图1.1是杂氮环丙烷(aziridine)在水中或乙醇溶剂中聚合化形成BPEI的过程，该反应需要控制反应温度，反应物浓度否则在低温下会形成一种巨大的无水在杂氮环丙烷聚合物^[15, 16]。

1.3.1.1.2 线型PEI

线型PEI (Line PEI, LPEI) 与其衍生物用作基因转染载体的研究比分枝状PEI (Branched PEI, BPEI) 要早一些，过去的研究认为在不考虑具体条件，LPEI/DNA转染复合物的细胞毒性较低，有利于细胞定位，因此与BPEI相比应该转染效率

高一些。但最近研究表明BPEI的分枝度高有利于形成小的转染复合物，从而提高转染效率，但同时细胞毒性也增大。超高分枝的、较柔性的PEI衍生物含有额外的仲胺基和叔胺基，在染实验中发现这种PEI的毒性低，但转染效率却较高。

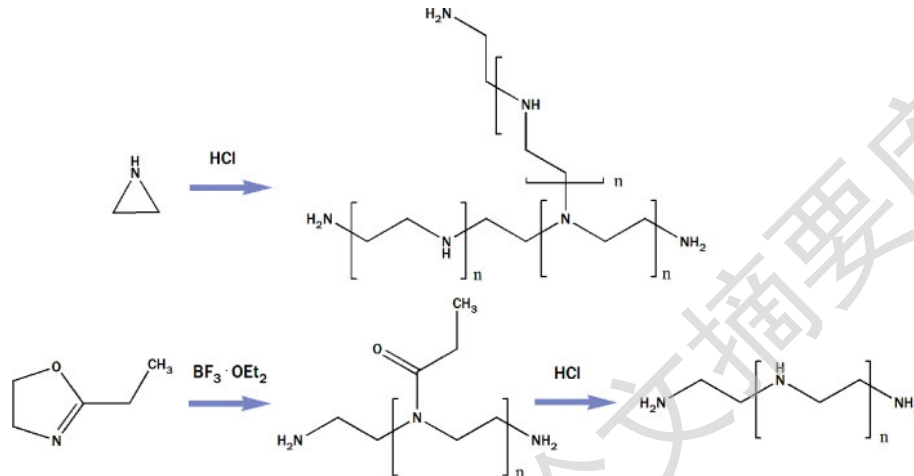


图1.2 线型PEI的合成

Figure 1.2 Synthesis of line polyethylenimine

(by John Wiley, 2005)

1.3.1.2 PEI与DNA的作用

N/P 比(N/P ratio)和zeta 电位(zeta potential)对转染效率的影响非常大。有人估计在生理条件下，大约有五六分之一的PEI的氨基氮被质子化^[17]，而且只有这些带正电荷的氨基才能与带负电的DNA以离子键结合。PEI分子内单个的氮原子的pKa值是不能测量的，所以氨基中确定的正电荷的量是不知道的。因此，N/P比例即PEI中氮原子的量和DNA中磷原子的量的比例只是用于简单的描述用于形成PEI/DNA复合物中PEI的量。当N/P比比较高时，相应复合物的净正电荷的量就比较大，与细胞的作用以及被细胞以及细胞核摄入和保留的可能性也就比较大^[18]。

转染基因的表达与颗粒大小有很大关系^[19]，颗粒大小与PEI的分子质量，形成颗粒的方法以及N/P比有关。聚合物的分子质量增加复合物颗粒的大小会下降，这种聚胺的过度以及低的离子强度很可能是增加DNA的束缚造成的。额外的蛋

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库